

成人ヒト間葉系細胞に内在する新規多能性幹細胞の探索

著者	黒田 康勝
号	80
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第2920号
URL	http://hdl.handle.net/10097/62397

氏 名	くろだ やすまさ 黒田 康勝
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	成人ヒト間葉系細胞に内在する新規多能性幹細胞の探索
論文審査委員	主査 教授 出澤 真理 教授 張替 秀郎 教授 後藤 昌史

論文内容要旨

近年、主に白血病などの血液疾患を治療する目的で骨髄移植が盛んに行われている。骨髄移植は骨髄バンクを利用することで非血縁者間でも行うことが可能であり、これまでに 1 万例を超える移植がなされてきた。現在、骨髄移植は donor の骨髄中に存在する造血幹細胞を移植する目的で行われているが、移植される骨髄液中には造血幹細胞以外に骨髄間葉系細胞(Bone Marrow Stromal Cell, BMSC)も含まれており、同時に移植されている。BMSC は生体内では骨髄中に存在しており、造血系細胞をサポートする役割を持っている。BMSC は、①同じ中胚葉系の骨や軟骨、脂肪へと分化することが可能であり、②骨髄液を培養すると接着性の細胞として採取される細胞集団の総称である。また高い増殖力を有するため必要な細胞数の確保が容易であることから、近年では患者本人の BMSC を採取・培養することで自己や同種の細胞移植治療に用いることが期待されている。さらに最近になり、BMSC が中胚葉系の細胞への分化以外にも外胚葉系の神経や、内胚葉系の肝細胞といった細胞へも分化することが可能であるとの報告もなされており、BMSC の持つ胚葉を超えた分化能に注目が集まっている。しかし、これらはほとんどが骨髄から接着性をもつ細胞を採取したのみの heterogeneous な BMSC の集団を用いて報告されたものである。そのため集団として 3 胚葉性の細胞への分化を示すものの、これが(1)“それぞれの系統へ commit した細胞が集合して BMSC を構成しており、それぞれの細胞が誘導に応じて分化しているだけ”なのか、(2)“BMSC の中に多能性を有することで知られている胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell ,ES 細胞)や人工多能性幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cell, iPS 細胞)のような特殊な細胞が存在しており、これが 3 胚葉性の細胞へと分化している”のかを決定付ける、再現可能な報告は未だなされておらず、不明なままである。一方、当研究室ではヒト BMSC を通常の接着培養で培養すると、ヒト ES 細胞と酷似

した細胞塊が自然発生的に形成されることを発見した。加えて、この細胞塊はしばらく増殖すると成長が止まり、内部に3胚葉性のマーカーが陽性の細胞が混在することを見出した。このことから、ヒト BMSC には3胚葉への分化が可能な、多能性幹細胞と考えられる細胞が内包されていることが示唆された。しかし、この細胞塊の形成率が非常に低いものであったことから、通常幹細胞の同定で試みられる表面抗原による絞り込み解析を行うのは困難であった。そこで、本研究では生体内における幹細胞の役割に着目した手法により、BMSC 中に内在している多分化能を有する細胞の単離を目的として実験を行った。また、近年 BMSC と同様に皮膚中に存在する間葉系細胞である fibroblast も、外胚葉系の神経への分化など、胚葉を超えた分化を行うことが可能であることを示唆されており注目されている。そこで、本研究では BMSC と同時に fibroblast から多分化能を有する細胞の単離を試みた。

生体内においては、幹細胞は各種ストレスに応じて活性化し、同ストレスにて損失した細胞を補填する役割を担っていると考えられている。そこで、申請者らはあえて細胞集団にストレスを与えることで幹細胞を濃縮することを考案した。そして最終的に長時間のトリプシン処理(Long-term Trypsin Treatment, LTT)を行うことで、BMSC および fibroblast の両方からストレス耐性を持つ細胞を単離した。この細胞は幹細胞研究で用いられる浮遊培養を行うことで1細胞から Cluster を形成することが可能であり、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞が発現することが知られている多能性幹細胞マーカーを発現することや自己複製能を有すること、さらには ES 細胞などで試みられるゼラチン上での培養を行うことで3胚葉性の細胞へと分化することを明らかにした。これらの結果は、申請者らが単離した細胞が多能性を持っていたことを示唆するものであり、この細胞を Multilineage differentiating stress enduring (Muse) cell と命名した。その後の解析で、一般的に免疫不全マウスへの移植を行うと teratoma を形成することで知られている ES 細胞や iPS 細胞とは異なり、Muse 細胞は移植部位周辺で3胚葉性の細胞へと分化するものの teratoma は形成しないことや、損傷モデルマウスへ尾静脈から移植すると損傷部位へ遊走し、それぞれの組織に見合った細胞へと分化することが明らかとなった。加えて、ヒトでは多能性幹細胞マーカーの1つである SSEA-3 の発現が LTT 処理の前後で有意に上昇しており、さらに BMSC および fibroblast 中に存在する SSEA-3 陽性の細胞が他の多能性幹細胞マーカーを発現していることを明らかにした。そしてこの SSEA-3 をマーカーとして用いることで、Muse 細胞をヒト新鮮骨髄液からも直接単離することが可能であることを明らかにした。これらの結果は、Muse 細胞が LTT 処理により誘導されるものではなく、元来生体内に存在している細胞であることを示唆するものである。

本研究で明らかになった結果から、Muse 細胞は多能性を持つ一方で腫瘍形成能を持たない、移植に用いるのに適した細胞であり、また骨髄から採取できることから、現存する骨髄バンクを血液疾患のみならず、その他の疾患に対する再生医療へそのまま応用利用することが可能であると期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題名.....成人ヒト間葉系細胞に内在する新規多能性幹細胞の探索.....

所属専攻・分野名.....医科学.....専攻・.....細胞組織学.....分野.....

学籍番号.....氏名.....黒田 康勝.....

近年、骨髄に存在している骨髄間葉系細胞(Bone Marrow Stromal Cell, BMSC)や皮膚に存在している線維芽細胞(fibroblast)などの間葉系細胞は胚葉を超えた分化を行うことが可能であるとの報告があり、その細胞集団中に多能性を有した細胞が含まれていることが示唆されていたが、これまでその本態が不明であった。本論文ではこの細胞の単離を行い、成人ヒトの生体に多能性幹細胞があることを示した。これらの細胞の解析を行うと共に、この細胞が生体内で組織修復能を持つことも明らかにした。

申請者は、これまでのいくつかの報告から”幹細胞がストレスに対して耐性を持つ”という仮説を立て、最終的に長時間のトリプシン処理を行うことで幹細胞を含む細胞集団を濃縮することに成功した。この集団の中の一部の細胞は幹細胞研究で用いられる浮遊培養を行うことで 1 細胞から細胞塊(Cluster)を形成することが可能であり、Oct3/4 や Nanog などを含めた多能性幹細胞マーカーを発現すること、自己複製能を有すること、肝細胞、胆道系細胞、神経、平滑筋、骨格筋、骨、軟骨、脂肪などの 3 胚様性の細胞へと分化することを明らかにした。また、一般的に免疫不全マウスへの移植を行うと奇形腫を形成することで知られている ES 細胞や iPS 細胞とは異なり、移植後半年を経ても奇形腫は形成しないこと、腫瘍性の活性が極めて低いことが明らかとなった。よって、ES・iPS 細胞などの人工的に樹立される多能性幹細胞とは異なり、本細胞は多能性があるが腫瘍性の無い細胞であることが分かった。さらに損傷モデルマウスへ尾静脈から移植すると損傷部位へ遊走し、それぞれの組織に応じた細胞へと分化することを明らかにした。ヒトでは多能性幹細胞マーカーの 1 つである SSEA-3 をマーカーとして用いることで、ヒト新鮮骨髄液からも培養操作をささむことなく、直接単離することが可能であることを明らかにし、申請者らはこの生体に存在する新規の多能性幹細胞を Multilineage differentiating stress enduring (Muse) cell と命名した。

本論文は間葉系細胞から多能性幹細胞を単離した初めてのものである。Muse 細胞は多能性を持つ一方で奇形腫を形成しないため、移植に用いるのに適した細胞である。また骨髄を採取源として使用できることから、現存する骨髄バンクを血液疾患のみならず、その他の疾患の治療へとつなげる非常に重要な研究であると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。